

## МЕТАГЕНОМИКА И БИОРАЗНООБРАЗИЕ СФАГНОВЫХ БОЛОТ

© 2016 г. Л. Ю. Русин<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup>Институт проблем передачи информации  
им. А.А. Харкевича Российской академии наук, Москва, 127051

<sup>b</sup>Биологический факультет Московского государственного университета  
им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991

e-mail: roussine@yandex.ru

Поступила в редакцию 17.10.2015 г.

Принята к печати 02.12.2015 г.

Биоразнообразие сфагновых болот характеризует одну из наиболее богатых экосистем, которая наименее изучена, несмотря на то, что представляет собой стратегически важный природный и хозяйственный ресурс. Для изучения факторов, обеспечивающих устойчивость и продуктивность популяции сфагновых мхов, в последние годы начаты исследования сообществ прокариотических микроорганизмов, ассоциированных с этими растениями. При использовании методов высокопроизводительного параллельного секвенирования (High-Throughput Sequencing, HTS) удалось показать функциональное разнообразие прокариотических микробных сообществ (микробиома) сфагнума и прояснить, какие элементы биохимических путей и генов семейств обеспечивают разнообразие способов их адаптации и весьма успешной колонизации сфагнумом обширных территорий Северного полушария. С другой стороны, данных о биоразнообразии эукариотических сообществ сфагновых болот немного, хотя актуальность таких исследований очевидна. В обзоре обсуждаются — в контексте современных методов метагеномики — перспективы исследований, значительно расширяющих возможности оценки таксономического состава, относительной численности отдельных групп микроскопических эукариот и их скрытого биоразнообразия в биотопах болот.

**Ключевые слова:** биоразнообразие, метагеномика, сфагнум, болота

**DOI:** 10.7868/S0026898416050153

Болота играют важнейшую роль в природных экосистемах. Средообразующим элементом большинства болот является сфагнум — космополитический род мхов, наиболее распространенный в бореальной зоне Северного полушария. Сфагновые мхи обладают способностью к катионному типу тканевого обмена и, благодаря этому, формируют особую закисленную среду [1]. Эта среда препятствует быстрому разложению органики, что приводит к накоплению углеродных соединений в виде торфа. Торфяники Северного полушария представляют собой глобальную систему фиксации и захоронения около трети запасов всемирного углерода [2], что превышает в 2–3 раза его запасы во всех тропических лесах планеты [3].

Около 4 млн км<sup>2</sup> поверхности земли заняты торфяными болотами, из них более половины находится на территории России. Торфяники играют важную роль в глобальном обмене парниковых газов и других важных компонентов атмосферы (CH<sub>4</sub>, CO, N<sub>2</sub>O, NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>S и других) и являются средообразующим фактором при формировании гидрологических и даже климатических особенностей экосистем (см., например, [4–6]). Общеизвестно

хозяйственное значение торфа как критически необходимого для многих регионов источника топлива, а также как изоляционного материала, природного сорбента и антисептика. В настоящее время основными потребителями сфагнума являются США, Европейский Союз и Япония, импортирующие большие количества сухого мха для хозяйственных нужд. В Канаде и странах ЕС разрабатываются технологии его культивирования, в том числе как возобновляемого биоресурса, поскольку запасы торфа вскоре могут быть исчерпаны: средняя скорость прироста торфяного слоя в природе крайне низка (0.75–1.00 см в год).

Важно осознать роль сфагновых болот не только как стратегического промышленного ресурса, но и как уникального резервуара и консерватора биологического разнообразия. Так, торфяные захоронения пыльцы высших растений, спор мхов и папоротников представляют большой интерес как источник информации для стратиграфического датирования климатических изменений на протяжении последнего ледникового периода. Состав пылевых отложений, а также реликтовые захоронения растительности служат основой

палеоэкологических исследований для реконструкции истории смены ландшафтов и растительных сообществ в контексте изменений климата [7, 8]; они являются также источником археологических данных по освоению человеком ландшафта на протяжении всего голоцена до современности [9, 10].

В последнее время проведены детальные исследования сообществ прокариотических микроорганизмов, ассоциированных со сфагновыми мхами, с целью изучения факторов, обеспечивающих устойчивость и продуктивность популяции этих растений [11–13]. В более ранних работах – с использованием методов дифференциального электрофореза – показано, что микробиом отдельных видов сфагнома высокоспецифичен и имеет разный индекс биоразнообразия, вне зависимости от географической привязки [14].

Появление методов высокопроизводительного параллельного секвенирования (*high-throughput sequencing*, HTS) ознаменовало эру новых возможностей и привело к формированию отдельного направления в науке – метабеномики. Высокая производительность секвенирования и развитие высокотехнологичных подходов на основе метода ПЦП позволяют точно определять состав отдельных ДНК-маркеров или целых оперонов из тотальных проб среды (*environmental DNA*, или *eDNA metabarcoding*). Эти данные могут быть использованы для быстрой и точной оценки таксономического профиля сообществ, в том числе для выявления скрытого биоразнообразия и других, ранее не описанных групп, а также для изучения функциональных групп генов и генных семейств в составе генофонда сообществ. Недавно опубликованные работы, основанные на методах HTS, согласуются с более ранними и подтверждают высокое таксономическое разнообразие сфагнового микробиома [15, 16].

Было показано, что гиалиновые клетки и стебли растений сфагнома поддерживают различные метанотрофные сообщества бактерий, вовлеченные в эффективный цикл усвоения и переработки метана как инструмента фиксации и захоронения углерода в экосистемах болот [17–20].

При отсутствии корневой системы у мхов бактериальные сообщества играют важную роль в снабжении растений органическими метаболитами и в обеспечении общих условий жизнеспособности и защиты от внешних факторов [21]. Это подтверждается данными о том, что степень видоспецифичности микробиома и спектр экологических групп бактерий напрямую коррелируют с набором вторичных метаболитов, производимых растениями [15], и определяются такими абиотическими факторами, как степень закисленности и трофность (т.е. содержание питательных веществ) среды [16]. Основной состав микробиома

сфагнома не только видоспецифичен, но и переносится между поколениями растений в составе спорных капсул [22], являя собой яркий пример реликтового эволюционно устойчивого метасообщества.

На основе масштабной сборки микробиома установлено функциональное разнообразие микробных сообществ сфагнома, а также выявлены элементы биохимических путей и генные семейства, обеспечивающие разнообразие адаптивных стратегий этих сообществ [23]. Обнаружены функциональные группы генов, само наличие которых предполагает тесную взаимосвязь растений и микроорганизмов в процессах азотфиксации и усвоения питательных веществ, выработки устойчивости к окислительному стрессу и к осушению. Микробные сообщества сфагнома отличаются от сообществ торфяного слоя и известных микробиомов высших растений, в частности высоким содержанием компонентов бактериальных генетических систем, вовлеченных в процессы дыхания (их относительная доля коррелирует с вертикальным градиентом кислорода [24]), и клеточной подвижности [25], что, как очевидно, играет важную роль в функционировании сообществ поверхностной пленки филлосферы. Относительная доля систем клеточного ответа на различные формы стресса, в особенности окислительного, также высока, наряду с системами синтеза белковых агентов усвоения железа (сидерофоров), которые характерны для сообществ олиготрофных и омбротрофных экосистем, а также известны как элементы антагонистического взаимодействия микробных сообществ [26].

В целом описание этих групп генов позволяет значительно расширить представления об особенностях функционирования прокариотического биоценоза сфагновых мхов. Так, высокое содержание в микробиоме мобильных элементов, характерных для сообществ симбиотических бактерий [27, 28], указывает на высокую вероятность наличия форм симбиоза между бактериями и мхом. Обилие элементов системы ответа на окислительный стресс, а также систем фиксации и усвоения азота [15, 16, 29] в обширном круге таксонов микробного сообщества, по-видимому, способствуют весьма успешной колонизации сфагнумом обширных территорий. Биохимические пути фиксации и усвоения азота представлены значительно полнее, чем системы его катаболизма, и это служит биологической основой важнейшей роли сфагновых болот в усвоении и захоронении органического материала в мировом масштабе. Наряду с открытием большого разнообразия функциональных групп генов в микробиоме, упомянутые работы свидетельствуют, что далеко не все группы бактерий в микробных сообществах сфагнома известны и описаны традиционными методами микробиологии.

На фоне столь важных результатов, полученных в области изучения микробиома сфагнома, очевидна необходимость исследования и биоразнообразия эукариотических сообществ сфагновых болот. Работы с использованием традиционных методов сбора материала и микроскопии, например [30], показывают, что значительная доля групп разного таксономического ранга одноклеточных эукариот и микроскопических животных в экосистеме сфагнового болота остается или неизвестной, или не описана систематиками. На основе уже полученных результатов этот биотоп в Германии, например, охраняется законом как ценный ресурс национального биоразнообразия. Микроскопические исследования подобных биотопов не только трудоемки и длительны, но и требуют участия целого ряда специалистов в области таксономии, что делает подобные проекты долгосрочными и часто трудновыполнимыми. Очевидно, что современные способы выявления эукариотического разнообразия предлагает метагеномика. На их основе может быть не только проведена каталогизация известных групп, но и выявлены масштабы скрытого биоразнообразия одноклеточных эукариот, микроскопических животных, растений и грибов. Известно множество публикаций, посвященных изучению биоразнообразия морских эукариот, включая сообщества бентоса, мейобентоса и планктона, методами HTS с использованием коротких штрих-кодов в составе генов 18S рРНК (вариабельные области V4 и V9) и 28S рРНК (вариабельные области D1, D2, D3) или межгенных рибосомных участков ITS [см., например, ссылки 31–35]. Кажется парадоксальным то, что сообщества глубоководных рифтовых зон изучены лучше, чем обитатели гораздо более доступных для исследования болот.

С использованием маркеров рибосомной ДНК получены данные о видовом богатстве эукариот и о пространственной регионализации сообществ в различных биотопах. Имеются работы, в которых подходы HTS используются для массового получения классических штрих-кодов (цитохром-С-оксидаза I, COI) при изучении состава пресноводных сообществ на видовом уровне [36]. Тем не менее, высокая степень вариабельности традиционных маркеров зачастую препятствует достоверной идентификации таксонов высокого ранга и снижает достоверность компьютерной обработки данных [37–39]. В этой связи представляется перспективным получение масштабного пула метагеномных данных не только в форме традиционных штрих-кодов, но и длинных, либо перекрывающихся ампликонов (whole genome shotgun). Кажется вероятным, что этот подход позволит обойти известные технические ограничения и получить достоверную информацию о таксономическом составе, относительной численности отдельных групп эука-

риот и охарактеризовать скрытое биоразнообразие биотопов болот.

Преимуществом получения полногеномных ампликонов является также и то, что возникает возможность охарактеризовать первичные геномные данные для широкого спектра таксонов микроэукариот, обитающих в биоценозе болот. Вероятность получения их полноразмерных геномов в обозримое время крайне мала. Кроме этого, анализ метагеномных данных — перспективный подход для выявления не описанных до сих пор таксономических групп.

Автор благодарен В.В. Алёшину за критическое прочтение рукописи.

Работа получила финансовую поддержку Российского фонда фундаментальных исследований (15-29-02765).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Soudzilovskaia N.A., Cornelissen J.H.C., During H.J., Van Logtestijn R.S.P., Lang S.I., Aerts R. 2010. Similar cation exchange capacities among bryophyte species refute a presumed mechanism of peatland acidification. *Ecology*. **91**, 2716–2726.
2. Gorham E. 1991. Northern peatlands: role in the carbon cycle and probable responses to climatic warming. *Ecol. Applic.* **1**, 182–195.
3. O'Neill K.P. 2000. Role of bryophyte-dominated ecosystems in the global carbon budget. In: *Bryophyte Biology*. Eds. Shaw A.J., Goffinet B. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 344–368.
4. Strack M. 2008. *Peatlands and Climate Change*. Jyväskylä, Finland: International Peat Society.
5. Dise N.B. 2009. Peatland response to global change. *Science*. **326**, 810.
6. Joosten H., Couwenberg J. 2009. *Are Emission Reductions from Peatlands MRV-Able?* Netherlands, Eds: Wetlands International.
7. Fyfe R.M. 2006. Sustainable conservation and management of the historic environment record in upland peat: a view from Exmoor. *Int. J. Biodivers. Sci. Management*. **2**, 146–149.
8. Van Der Putten N., Verbruggen C., Ochyra R., Spassov S., De Beaulieu J.L., De Dapper M., Thouveny N. 2009. Peat bank growth, Holocene palaeoecology and climate history of South Georgia (sub-Antarctica), based on a botanical macrofossil record. *Quat. Sci. Rev.* **28**, 65–79.
9. Fyfe R.M. 2012. Bronze Age landscape dynamics: spatially detailed pollen analysis from a ceremonial complex. *J. Archaeolog. Sci.* **39**, 2764–2773.
10. Davies H., Fyfe R.M., Charman D. 2015. Does peatland drainage damage the palaeoecological record? *Rev. Palaeobotany Palynology*. **221**, 92–105.
11. Berg G., Zachow C., Müller H., Philipps J., Tilcher, R. 2013. Next-generation bio-products sowing the seeds of success for sustainable agriculture. *Agronomy*. **3**, 648–656.
12. Bulgarelli D., Schlaeppi K., Spaepen S., van Themaat E.V.L., Schulze-Lefert P. 2013. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **64**, 807–838.

13. Philippot L., Raaijmakers J.M., Lemanceau P., van der Putten W.H. 2013. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Rev. Microbiol.* **11**, 789–799.
14. Opelt K., Berg C., Schönmann S., Eberl L., Berg G. 2007. High specificity but contrasting biodiversity of Sphagnum-associated bacterial and plant communities in bog ecosystems independent of the geographical region. *ISME J.* **1**, 502–516.
15. Bragina A., Maier S., Berg C., Müller H., Chobot V., Hadacek F., Berg G. 2011. Similar diversity of Alphaproteobacteria and nitrogenase gene amplicons on two related *Sphagnum* mosses. *Front. Microbiol.* **2**, 275.
16. Bragina A., Berg C., Müller H., Moser D., Berg G. 2013. Insights into functional bacterial diversity and its effects on Alpine bog ecosystem functioning. *Sci. Reports.* **3**, 1955.
17. Raghoebarsing A.A., Smolders A.J., Schmid M.C., Rijpstra W.I.C., Wolters-Arts M., Derksen J., Jetten M.S.M., Schouten S., Sinninghe Damsté J.S., Lamers L.P.M., Roelofs J.G.M., den Camp H.J.M.O., Strous M. 2005. Methanotrophic symbionts provide carbon for photosynthesis in peat bogs. *Nature.* **436**, 1153–1156.
18. Larmola T., Tuittila E. S., Tirola M., Nykänen H., Martikainen P.J., Yrjälä K., Tuomivirta T., Fritze H. 2010. The role of *Sphagnum* mosses in the methane cycling of a boreal mire. *Ecology.* **91**, 2356–2365.
19. Kip N., Ouyang W., van Winden J., Raghoebarsing A., van Niftrik L., Pol A., Pan Y., Bodrossy L., van Donseelaar E.G., Reichart G.-J., Jetten M.S.M., Sinninghe Damsté J.S., den Camp H.J.M.O. 2011. Detection, isolation, and characterization of acidophilic methanotrophs from *Sphagnum* mosses. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 5643–5654.
20. Putkinen A., Larmola T., Tuomivirta T., Siljanen H. M., Bodrossy L., Tuittila E.S., Fritze H. 2012. Water dispersal of methanotrophic bacteria maintains functional methane oxidation in *Sphagnum* mosses. *Front. Microbiol.* **3**, 15.
21. Opelt K., Chobot V., Hadacek F., Schönmann S., Eberl L., Berg G. 2007. Investigations of the structure and function of bacterial communities associated with *Sphagnum* mosses. *Environ. Microbiol.* **9**, 2795–2809.
22. Bragina A., Berg C., Cardinale M., Shcherbakov A., Chebotar V., Berg G. 2012. *Sphagnum* mosses harbour highly specific bacterial diversity during their whole lifecycle. *ISME J.* **6**, 802–813.
23. Bragina A., Oberauer-Wappis L., Zachow C., Halwachs B., Thallinger G.G., Müller H., Berg G. 2014. The *Sphagnum* microbiome supports bog ecosystem functioning under extreme conditions. *Mol. Ecol.* **23**, 4498–4510.
24. Tveit A., Schwacke R., Svenning M.M., Urlich T. 2013. Organic carbon transformations in high-Arctic peat soils: key functions and microorganisms. *ISME J.* **7**, 299–311.
25. Delmotte N., Knief C., Chaffron S., Innerebner G., Roschitzki B., Schlapbach R., von Mering C., Vorholt J.A. 2009. Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**, 16428–16433.
26. Opelt K., Berg G. 2004. Diversity and antagonistic potential of bacteria associated with bryophytes from nutrient-poor habitats of the Baltic Sea Coast. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 6569–6579.
27. Ochman H., Moran N.A. 2001. Genes lost and genes found: evolution of bacterial pathogenesis and symbiosis. *Science.* **292**, 1096–1099.
28. Thomas T., Rusch D., DeMaere M.Z., Yung P.Y., Lewis M., Halpern A., Heidelberg K.B., Egan S., Steinberg P.D., Kjelleberg S. 2010. Functional genomic signatures of sponge bacteria reveal unique and shared features of symbiosis. *ISME J.* **4**, 1557–1567.
29. Berg A., Danielsson Å., Svensson B.H. 2013. Transfer of fixed-N from N2-fixing cyanobacteria associated with the moss *Sphagnum* riparium results in enhanced growth of the moss. *Plant Soil.* **362**, 271–278.
30. Kreutz M., Foissner W. 2006. *The Sphagnum Ponds of Simmelried in Germany: a Biodiversity Hot-Spot for Microscopic Organisms.* Aachen: Shaker Verlag.
31. Fonseca V.G., Carvalho G.R., Sung W., Johnson H.F., Power D.M., Neill S.P., Packer M., Blaxter M.L., Lambshead P.J.D., Thomas W.K., Creer S. 2010. Second-generation environmental sequencing unmasks marine metazoan biodiversity. *Nature Commun.* **1**, 98.
32. Stoeck T., Bass D., Nebel M., Christen R., Jones M.D., Breiner H.W., Richards T.A. 2010. Multiple marker parallel tag environmental DNA sequencing reveals a highly complex eukaryotic community in marine anoxic water. *Mol. Ecol.* **19**, 21–31.
33. Bik H.M., Sung W.A.Y., De Ley P., Baldwin J.G., Sharma J., Rocha-Olivares A.X., Thomas W.K. 2012. Metagenetic community analysis of microbial eukaryotes illuminates biogeographic patterns in deep-sea and shallow water sediments. *Mol. Ecol.* **21**, 1048–1059.
34. Logares R., Audic S., Bass D., Bittner L., Boutte C., Christen R., Claverie J.M., Decelle J., Dolan J.R., Dunthorn M., Edvardsen B., Gobet A., Kooistra W.H., Mahé F., Not F., Ogata H., Pawlowski J., Pernice M.C., Romac S., Shalchian-Tabrizi K., Simon N., Stoeck T., Santini S., Siano R., Wincker P., Zingone A., Richards T.A., de Vargas C., Massana R. 2014. Patterns of rare and abundant marine microbial eukaryotes. *Curr. Biol.* **24**, 813–821.
35. Fonseca V.G., Carvalho G.R., Nichols B., Quince C., Johnson H.F., Neill S.P., Lambshead J.D., Thomas W.K., Power D.M., Creer S. 2014. Metagenetic analysis of patterns of distribution and diversity of marine meiobenthic eukaryotes. *Global Ecol. Biogeography.* **23**, 1293–1302.
36. Hajibabaei M., Shokralla S., Zhou X., Singer G.A., Baird D.J. 2011. Environmental barcoding: a next-generation sequencing approach for biomonitoring applications using river benthos. *PLoS One.* **6**, e17497.
37. Nilsson R.H., Kristiansson E., Ryberg M., Hallenberg N., Larsson K.H. 2008. Intraspecific ITS variability in the kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evol. Bioinform. Online.* **4**, 193.
38. Huber J.A., Morrison H.G., Huse S.M., Neal P.R., Sogin M.L., Welch M.D.B. 2009. Effect of PCR amplicon size on assessments of clone library microbial diversity and community structure. *Environ. Microbiol.* **11**, 1292–1302.
39. Dunthorn M., Otto J., Berger S.A., Stamatakis A., Mahé F., Romac S., de Vargas C., Audic S., BioMarKs Consortium, Stock A., Kauff F., Stoeck T. 2014. Placing environmental next-generation sequencing amplicons from microbial eukaryotes into a phylogenetic context. *Mol. Biol. Evol.* **31**, 993–1009.

**METAGENOMICS AND BIODIVERSITY OF SPHAGNUM BOGS****L. Y. Rusin<sup>1, 2</sup>**<sup>1</sup>*Kharkevich Institute for Information Transmission Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, 127051 Russia*<sup>2</sup>*Department of Biology, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia**e-mail: roussine@yandex.ru*

Biodiversity of sphagnum bogs is one of the richest and less studied, while these ecosystems are among the top in ecological, conservation and economic value. Recent studies report detailed research of prokaryotic consortia associated with sphagnum mosses and reveal factors that maintain sustainability and productivity of bog ecosystems. High-throughput sequencing technologies allowed to get insight into functional diversity of moss microbial communities, identify biochemical pathways and gene families that facilitate the spectrum of adaptive strategies and largely foster the very successful colonization of the Northern hemisphere by sphagnum mosses. Rich and valuable information obtained on microbiomes of peat bogs set off the paucity of evidence on their eukaryotic diversity. Perspectives and expectations of reliable assessment of taxonomic profiles, relative abundance of taxa and uncovering hidden biodiversity of microscopic eukaryotes in sphagnum bog ecosystems are briefly outlined in the context of today's metagenomics.

**Keywords:** metagenomics, biodiversity, sphagnum, bogs